製品コード CY210

食品・環境分析用

TaKaRa

Cycleave®PCR *Legionella* (5S rRNA) Detection Kit Ver.2.0

説明書

v201406Da

レジオネラ属菌は、*Legionella pneumophila* に代表される好気性のグラム陰性桿菌で、土壌や淡水に生息し、冷却塔水、循環式水槽水、温泉などの環境水を広く汚染します。汚染水のエアロゾル吸入や誤嚥など環境水を介したレジオネラ属菌の感染により、レジオネラ症と呼ばれる疾患が引き起こされます。現在、レジオネラ属は 55 菌種以上が知られており、その全ての菌種がレジオネラ症（レジオネラ肺炎）を引き起こす可能性がありますが、レジオネラ症の患者および環境水からの検出率が最も高いのは *Legionella pneumophila* です。平成 21 年 4 月に「第 3 版レジオネラ症防止指針」（発行：財団法人ビル管理教育センター）が改定発刊され、迅速検査法のひとつとして「リアルタイム PCR 法」が収載されました。蛍光物質を使用して PCR 増幅産物をリアルタイムでモニターし解析するリアルタイム PCR 法は、簡便性、迅速性、反応特異性の高さから、近年、環境衛生管理において急速に普及しています。レジオネラ症への対策においても、感染源の特定や、営業停止施設の再開時期決定などの緊急対応に有効活用できることが期待されています。

本製品はレジオネラ属菌の 5S rRNA 遺伝子をターゲットとする広範囲な検出をリアルタイム PCR 装置で行うためのキットです。増幅反応には Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*® HS を使用していますので、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができます。増幅産物の検出にはサイクリングプローブ法を採用しています。サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができます。プローブは片方の端が蛍光物質で、もう片方の端がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、配列が相補的な増幅産物とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになります（図 1 参照）。この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることが出来ます。
Ver.2 では、キットに含まれる 5S Positive Control 2 を用いて検量線を作成することにより、定量が可能になりました。
また、キットにはレジオネラ属菌由来 5S rRNA 遺伝子を検出するための FAM 標識プローブに加え、インターナルコントロールとインターナルコントロール検出用の ROX 標識プローブが含まれています。二波長を同時にモニタリングすることで、一本のチューブでレジオネラ由来 5S rRNA 遺伝子の検出とインターナルコントロールの検出による偽陰性のモニターが可能です。リアルタイム検出なので、電気泳動が不要であり、迅速に結果が得られます。

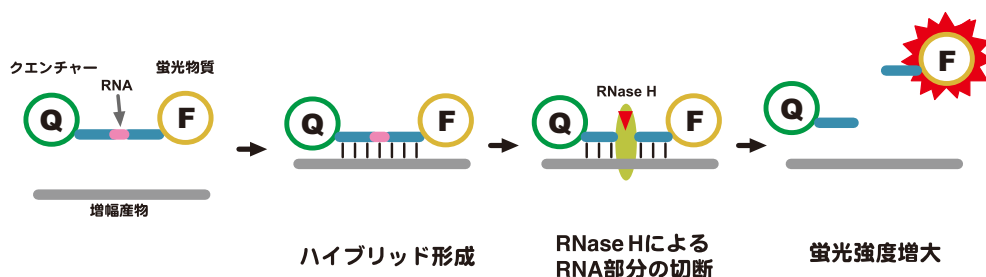



図 1. サイクリングプローブ法の原理

I. キットの内容（25 μl 反応、50 回分）

1.	2 × Cycleave Reaction Mixture	2 × conc.	625 μl
2.	5S Primer/Probe Mix（FAM、ROX）＊1	5 × conc.	250 μl
3.	dH_2O		1 ml
4.	5S Positive Control 2＊2	1 × 10^4 copies/μl	100 μl
5.	EASY Dilution（for Real Time PCR）＊2		1 ml × 2

＊1：蛍光標識プローブを含んでいますので、遮光に留意してください。
＊2：リアルタイム PCR コンポーネント（1 ～ 3）に誤って混入すると、正しい検出反応を行うことができなくなります。リアルタイム PCR コンポーネント（1 ～ 3）は付属のキットケースに移し、別に保存するようにしてください。

2 × Cycleave Reaction Mixture：

PCR 反応試薬です。反応に必要な酵素、Buffer、dNTP Mixture を含みます。

5S Primer/Probe Mix：

インターナルコントロールを含むプライマー・プローブ溶液です。プライマーにより、ターゲット遺伝子およびインターナルコントロールを増幅し、異なる蛍光色素が標識されたプローブにより、ターゲット遺伝子またはインターナルコントロールを検出します。ターゲット遺伝子検出用プローブは FAM、インターナルコントロール検出用プローブは ROX という蛍光物質で標識されています。

インターナルコントロール：

ターゲット増幅用のプライマーで増幅されますが、ターゲット遺伝子とは無関係な内部配列を有する DNA 分子で、偽陰性の判定を目的としています。全ての反応系に存在させることで、ターゲットが不検出の場合、インターナルコントロールの検出ができていれば PCR 反応阻害が起こっておらず、ターゲットは検出限界以下と判定できます。ターゲット、インターナルコントロールがともに検出されない場合、PCR 反応が正常に進まなかったことがわかります。なお、ターゲットの DNA 量が多いと、そのターゲットの増幅反応が優先され、インターナルコントロールのシグナルの立ち上がりが遅くなる、シグナル強度が弱くなる、あるいはシグナルが得られないケースがあります。この場合は、ターゲット遺伝子の検出が正しくなされており、陽性であると判定できます。

ターゲット遺伝子：

標的となる遺伝子。このキットの場合、レジオネラ由来 5S rRNA 遺伝子のことです。

dH_2O：滅菌水です。

5S Positive Control 2：

レジオネラ由来 5S rRNA 遺伝子用陽性コントロールです。
検量線作成用のスタンダードとして使用します。

EASY Dilution（for Real Time PCR）：

検量線作成用のスタンダードサンプルを調製する際の鋳型 DNA の希釈溶液です。鋳型 DNA を滅菌水や TE で希釈すると、チューブへの吸着などにより正確な希釈ができない場合がありますが、本品を用いると低濃度までの正確な希釈が可能となります。また、本品は、キャリアーとして tRNA や rRNA などの核酸を使用していないので、それらの配列に起因する非特異的増幅の問題が生じることもありません。

II. 保存　　　－ 20℃（輸送、保存とも）

III. キット以外に必要な機器、試薬（主なもの）

＜検出反応に必要なもの＞

・リアルタイム PCR 装置および専用チューブ
  - Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
    Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
      解析には食品環境検査用ソフトウェア、または Thermal Cycler Dice Real Time System Software を用いてください。
  - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Tecnologies）など

・卓上遠心器
・200 μl、20 μl、10 μl　各マイクロピペット
・マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

＜ DNA サンプルの調製に必要なもの＞

・フィルターホルダー（47 mm メンブレンフィルター用）
・メンブレンフィルター（直径 47 mm、孔径 0.22 μm；Millipore 社製 Code GTTP04700、Isopore メンブレフィルターなど）
・濾過びん
・吸引ポンプ
・ピンセット
・滅菌 50 ml コニカルチューブ
・ボルテックスミキサー
・2.0 ml マイクロチューブ
・微量高速冷却遠心機
・NucleoSpin Tissue XS（製品コード 740901.10/.50/.250）
・特級エタノール（＞ 99%）
・ヒートブロック（56℃および 70℃で使用可能なもの）
・マイクロピペット
・マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

IV. 使用に際して

本キットを使用する際の注意事項です。**使用前に必ずお読みください。**

1. 使用目的：本キットは環境分析に使用する製品です。

2. 測定結果：本キットは遺伝子検出であるため、死菌も検出されます。従って、生菌のみの検出が必要な場合は、培養法による検査も行い、結果を判定してください。
（検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は、一切の責任を負いません。）

3. 廃棄：試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または 2.5%次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。プラスチック、ろ紙の試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

V. 検出可能な菌種

1. 以下のレジオネラ属菌について本製品での検出が可能であるか否かを確認しています。

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	本製品での検出
1	NIIB0145	*L. adelaidensis*		E	1762-AUS-E	49625	−
2	NIIB0040	*L. anisa*		E	WA-316-C3	35292	+
3	NIIB0405	*L. beliardensis*		E	Montbe'liard A1	700512	−
4	NIIB0057	*L. birminghamensis*		C	1407-AL-H	43702	+
5	NIIB0009	*L. bozemanii*	1	C	WIGA	33217	+
6	NIIB0687	*L. bozemanii*	2	C	Tronto-3	35545	+
7	NIIB0114	*L. brunensis*		E	441-1	43878	+
8	NIIB1254	*L. busanensis*		E	KCTC 12084、K9951	700510	−
9	NIIB0047	*L. cherrii*		E	ORW	35252	+
10	NIIB0113	*L. cincinnatiensis*		C	72-OH-H	43753	+
11	NIIB0417	*L. donaldsonii*		C	MDA 2706	BAA-693	+
12	NIIB0406	*L. drozanskii*		E	LLAP-1	700990	−
13	NIIB0078	*L. dumoffii*		E	NY 23	33279	+
14	NIIB0049	*L. erythra*	1	E	SE-32A-C8	35303	+
15	NIIB0146	*L. fairfieldensis*		E	1725-AUS-E	49588	+
16	NIIB0408	*L. fallonii*		E	LLAP-10	700992	−
17	NIIB0688	*L. feeleii*	1	E	WO-44C	35072	+
18	NIIB0689	*L. feeleii*	2	C	691-WI-H	35849	+
19	NIIB0193	*L. geestiana*		E	1308	49504	(+)
20	NIIB0234	*L. gormanii*		E	LS-13	33297	+
21	NIIB0147	*L. gratiana*		E	Lyon 8420412	49413	+
22	NIIB0404	*L. gresilensis*		E	Gre'oux 11D13	700509	−
23	NIIB0690	*L. hackeliae*	1	C	Lansing 2	35250	+
24	NIIB0691	*L. hackeliae*	2	C	798-PA-H	35999	+
25	NIIB0053	*L. israelensis*		E	Bercovier 4	43119	−
26	NIIB0046	*L. jamestowniensis*		E	JA-26-G1-E2	35298	+
27	NIIB0014	*L. jordanis*		E	BL-540	33623	+
28	NIIB0148	*L. lansingensis*		C	1677-MI-H	49751	+
29	NIIB0194	*L. londiniensis*	1	E	1477	49505	−
30	NIIB1255	*L. londiniensis*	2	E	Mulhouse B26	BAA-518	−
31	NIIB0692	*L. longbeachae*	1	C	Long Beach 4	33462	+
32	NIIB0693	*L. longbeachae*	2	C	Tucker 1	33484	+
33	NIIB0045	*L. maceachernii*		E	PX-1-G2-E2	35300	+
34	NIIB0008	*L. micdadei*		C	TATLOCK	33218	+
35	NIIB0116	*L. moravica*		E	316-36	43877	+
36	NIIB0195	*L. nautarum*		E	1224	49506	+
37	NIIB0036	*L. oakridgensis*		E	OR-10	33761	−
38	NIIB0042	*L. parisiensis*		E	PF-209C-C2	35299	+

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	本製品での検出
39	NIIB0001	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	1	C	Philadelphia-1	33152	+
40	NIIB0002	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	2	C	Togus-1	33154	+
41	NIIB0003	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	3	E	Bloomington-2	33155	+
42	NIIB0004	*L. pneumophila* subsp. *fraseri*	4	C	Los Angeles-1	33156	+
43	NIIB0005	*L. pneumophila* subsp. *fraseri*	5	E	Dallas 1E	33216	+
44	NIIB0150	*L. pneumophila* subsp. *pascullei*	5	E	U8W	33737	+
45	NIIB0006	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	6	C	Chicago 2	33215	+
46	NIIB0033	*L. pneumophila*	7	E	Chicago 8	33823	+
47	NIIB0034	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	8	C	Concord 3	35096	+
48	NIIB0304	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	9	E	IN-23-G1-C2	35289	+
49	NIIB0050	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	10	C	Leiden 1	43283	+
50	NIIB0051	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	11	C	797-PA-H	43130	+
51	NIIB0060	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	12	C	570-CO-H	43290	+
52	NIIB0061	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	13	C	82A3105	43736	+
53	NIIB0062	*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*	14	C	1169-MN-H	43703	+
54	NIIB0063	*L. pneumophila* subsp. *fraseri*	15	C	Lansing 3	35251	+
55	NIIB0451	*L. pneumophila*	untypable	E	H13-192		+
56	NIIB0453	*L. pneumophila*	untypable	E	H13-206		+
57	NIIB0462	*L. pneumophila*	untypable	E	H13-239		+
58	NIIB0196	*L. quateirensis*		E	1335	49507	+
59	NIIB0260	*L. quinlivanii*	2	E	LC870	BAA-538	+
60	NIIB0407	*L. rowbothamii*		E	LLAP-6	700991	+
61	NIIB0048	*L. rubrilucens*		E	WA-270A-C2	35304	+
62	NIIB0039	*L. sainthelensi*	1	E	Mt St Helens 4	35248	+
63	NIIB0207	*L. sainthelensi*	2	C	Ly176.97	700517	+
64	NIIB0409	*L. santicrucis*		E	SC-63-C7	35301	+
65	NIIB0149	*L. shakespearei*		E	214	49655	+
66	NIIB0043	*L. spiritensis*	1	E	Mt St Helens 9	35249	−
67	NIIB0261	*L. spiritensis*	2	E	ML76	BAA-537	−
68	NIIB0041	*L. steigerwaltii*		E	SC-18-C9	35302	+
69	NIIB0262	*L. taurinensis*		E	Turin I no 1	700508	+
70	NIIB0117	*L. tucsonensis*		C	1087-AZ-H	49180	+
71	NIIB0032	*L. wadsworthii*		C	81-716A	33877	+
72	NIIB0206	*L. waltersii*		E	2074-AUS-E	51914	+
73	NIIB0197	*L. worsleiensis*		E	1347	49508	+
74	NIIB0305	*Legionella* genomospecies 1		E	2055-AUS-E	51913	+

検出＋：　10 cfu/tube 相当の DNA 量を用いた場合、陽性結果が得られたもの
検出（＋）：10 cfu/tube 相当の DNA を用いた場合は不検出、100 cfu/tube 相当以上の DNA を用いた場合で陽性結果が得られたもの
検出 −：　10,000 cfu/tube 相当の DNA 量を用いた場合、不検出結果になったもの

厚生労働科学研究費補助金　地域健康危機管理研究事業 「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」 平成 19 年度総括・分担研究報告書から引用

2. 以下の菌種などについて、クロス反応がないことを確認しています。

Serratia marcescens　*Alcaligenes faecalis*
Klebsiella pneumonia subsp. *pneumoniae*
Staphylococcus epidermidis
Achromobacter xylosoxidans subsp. *denitrificans*
Streptcoccus pyogenes　*Pseudomonas fluorescens*
Pseudomonas aeruginosa　*Pseudomonas stutzeri*
Acinetobacter baumannii　*Acinetobacter lwoffii*
Myroides odoratus　*Escherichia coli* O157：H7
Salmonella Typhimurium　*Salmonella Agona*
Salmonella Enteritidis　*Salmonella Dublin*
Salmonella Infantis　*Salmonella Arizonae*
Citrobacter freundii　*Morganella morganii*
Staphylococcus aureus enterotoxin A、B、C、D、E、F、G、H
（human genome）

VI. 操作上の注意

1. リアルタイム PCR 装置の取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。

2. 万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。

3. 陽性と判定された検体は、さらに微生物学的な手法を用いて確認してください。

4. 反応液の調製から検出まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

   ○エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
   ○エリア 2：検体の調製を行います。
   ○エリア 3：検体の反応液への添加と、反応および検出を行います。

   本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。また、コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

5. 本キットはリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行います。リアルタイム PCR 装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

VII.　5S Positive Control 2 を用いる定量解析について

本製品に含まれる 5S Positive Control 2 は、レジオネラ由来の 5S rRNA 遺伝子領域を搭載したプラミド DNA であり、OD_{260} 値より換算した値で 1×10^4 copies/μl に調整されています。EASY Dilution（for Real Time PCR）を用いて 5S Positive Control 2 の 10 倍希釈系列を作製し、スタンダードサンプルとして用いて検量線を作成することで、定量解析を行うことができます。
ただし、本キットは遺伝子検出用キットであるため、死菌の遺伝子も検出されます。正確な生菌数が必要な場合には、培養法による検査も行う必要があります。

＜解析例＞

出展：厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」：平成 19 年度総括・分担研究報告書 P17 または P29 図 1、および P23 - 34

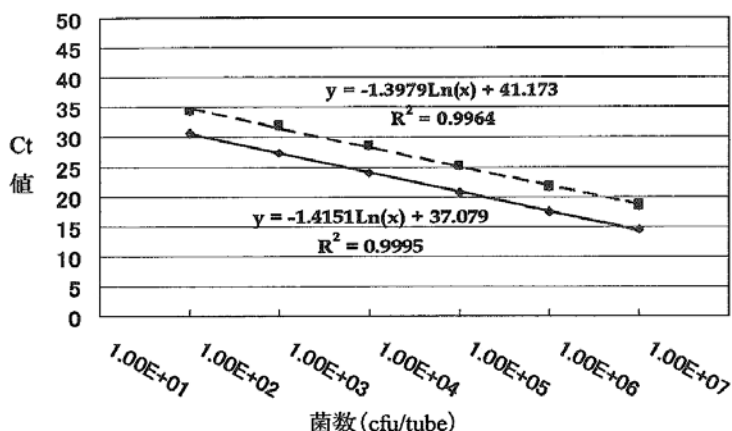



図 2.　リアルタイム PCR による検量線

菌抽出 DNA（◆）を用いたリアルタイム PCR 結果に基づく検量線と、プラスミド DNA（■）を用いて得られた検量線はほぼ平行関係にあり、DNA の増幅効率に差がないことが示された。また、y 軸との接点の差が 4 程度（≒ 41.2 − 37.1）であることから、培養 4 日目の菌 1 cfu 相当から得られる 5S DNA 量は抽出効率や反応効率を含めてプラスミド 17（≒ 2^4）コピーに相当するものと計算される。

VIII. 操作

＜ 5S Positive Control 2 を用いる定量解析＞

操作の概要

1. サンプルの調製
2. リアルタイム PCR 装置のセッティング
3. 反応液の調製と反応開始

    5S Positive Control 2 を段階希釈して検量線作成用スタンダードサンプルを調製する。

    ↓

    反応液を調製する。

    ↓

    反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール（滅菌水）、または検量線作成用スタンダードサンプル、または検体サンプルを添加する。

    ↓

    反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する。

    ↓

4. 結果表示

    画面上にリアルタイムで増幅曲線が表示される。

    ↓

    反応終了

    ↓

    検量線から検体サンプルのコピー数を求める。

    ↓

    菌数（cfu）に換算する。

VIII-1. サンプルの調製例（エリア 2 で実施）

下記は、「第 3 版レジオネラ症防止指針」に記載された「ろ過濃縮法」に沿ったサンプル調製の一例です。

なお、リアルタイム PCR による検出は、非常に高感度です。実験環境や使用器具の汚染には極力注意を払い、コンタミネーションの防止に心がけてください。

例）・可能な限り、使い捨て器具を使用する。（採水容器やフィルターホルダーなど）
・使い捨てにできないものは、洗浄後、乾熱滅菌処理を施す。（ピンセットなど）
・マイクロピペットは用途別に準備する。（リアルタイム PCR 試薬調製用、鋳型調製用を分ける。）

［試料の濃縮］

（1） フィルターホルダー（47 mm フィルター用）に、メンブランフィルター（直径 47 mm、孔径 0.22 μm または 0.45 μm）をセットする。
（2） 試料水 500 ml をメンブランフィルターで吸引濾過する。
（3） 吸引終了後、フィルターを滅菌ピンセットで剥がし、50 ml 滅菌コニカルチューブに入れる。
（4） チューブに滅菌蒸留水 5 ml を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間混和する。
（5） 混和液 2 ml を 2 ml 用マイクロチューブにとる。
（6） 13,000 ～ 15,000 rpm で 4℃、5 分間遠心分離後、上清（950 μl × 2）を穏やかにマイクロピペットで吸い取って除去し、残渣液 100 μl を残す。

[DNA 抽出（NucleoSpin Tissue XS を用いた方法）]

製品の取扱説明書に従って操作してください。

（1） 残渣液 60 μl に Buffer T1 を 160 μl 加える。軽く混合して、スピンダウンする。
（2） さらに Proteinase K＊1 を 16 μl 加える。ボルテックスにて混合（5秒×2）して、スピンダウンする。
（3） 56℃、10 分間インキュベートする。
（4） スピンダウンしたサンプルに Buffer B3 を 160 μl 加える。ボルテックスにて混合（5秒×2）して、スピンダウンする。
（5） 70℃、5 分間インキュベートし、ボルテックスする。
（6） 各サンプルが室温に戻ったことを確認して、スピンダウンしたサンプルにエタノール（96 ～ 100%）を 160 μl 加え、ボルテックスにて混合（5秒×2）して、軽くスピンダウンする。
（7） NucleoSpin Tissue XS Column を Collection Tube（2 ml）にセットする。
（8） （6）の溶液をカラムに添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心する。
（9） カラムを新しい Collection Tube（2 ml）にセットする。
（10） カラムに Buffer B5＊2 を 50 μl 添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心する。ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
（11） カラムに Buffer B5＊2 を 50 μl 添加し、11,000 × *g*、2 分間遠心する。カラム上に液が残っていないことを確認する。
（12） カラムを 1.5 ml マイクロチューブにセットする。
（13） カラムに Buffer BE を 20 μl 添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心し、DNA 溶液を回収する。
（14） 回収液のうち、5 μl を PCR に用いる。

＊1： Proteinase K：製品コード 740901.50（50 回用）の場合；
Proteinase K（凍結乾燥品）20 mg（1 vial）に、Proteinase Buffer 1 ml を加え溶解する。溶解後の Proteinase K 溶液は－ 20℃で保存する。
＊2： Buffer B5：Wash Buffer B5（concentrate）2 ml あたり、8 ml のエタノールを加える。

実験にあたっては、手袋、マスク、防御眼鏡を使用し、安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内で操作してください。

VIII-2. 反応液の調製と反応開始

本製品は 1 本の反応チューブ内でレジオネラ由来 5S rRNA 遺伝子とインターナルコントロールの増幅産物を同時に検出します。正しい検出結果を得るために、ネガティブコントロール反応を一緒に行ってください。

(1) 5S Positive Control 2 ●を用いて、検量線作成用のスタンダードサンプルの段階希釈液を調製する。(エリア 3 で実施)

EASY Dilution ●で以下の 1 ～ 5 の濃度の段階希釈液を調製する。(1 反応にはそれぞれ 5 μl を使用。N=2 以上での反応を推奨)

1. 10^4 copies/μl (5S Positive Control 2 原液)
2. 10^3 copies/μl (5S Positive Control 2 原液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl)
3. 10^2 copies/μl (2. の 10^3 copies/μl 溶液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl)
4. 10 copies/μl (3. の 10^2 copies/μl 溶液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl)
5. 1 copy/μl (4. の 10 copies/μl 溶液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl)

※ 5 × 10 ～ 5 × 10^4 copies の 4 点による検量線が作成できることを確認している。

(2) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

検体サンプル等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数＋α分調製し、各反応チューブに 20 μl ずつ分注して軽くキャップをしめる。その内の 1 本に陰性コントロールとして滅菌水 5 μl を加え、反応チューブのキャップをしっかり閉める。(N=2 以上での反応を推奨)

	液量 (1 反応)	最終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture ●	12.5 μl	1 ×
5S Primer/Probe Mix (5 × conc.) ●	5 μl	1 ×
検体サンプルまたは検量線作成用スタンダードサンプルまたは滅菌水	(5 μl) *	
dH_2O ○	2.5 μl	
	25 μl	

*： 検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えない。

エリア 3 へ移動する。

(3) サンプル (鋳型) の添加 (エリア 3 で実施)

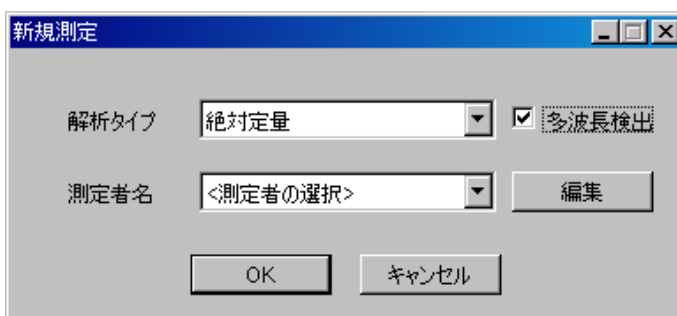
陰性コントロール以外の反応チューブについて、検体サンプルや検量線作成用スタンダードサンプルを、(2) で分注した調製液に添加し、反応チューブのキャップをしっかり閉める。
蛍光測定を行うため、チューブに汚れがつかないように注意し、キャップを閉めるときは手袋を着用する。0.2 ml チューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

VIII-3. リアルタイム PCR 装置による増幅～検出、定量解析および cfu 換算（エリア 3 で実施）

操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。
ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System *II* または *Lite*（タカラバイオ）を使用した場合の簡単な操作方法と定量解析について示します。
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Tecnologies）を使用する場合は、18 ページをご参照ください。

【 Thermal Cycler Dice Real Time System：食品環境検査用ソフトウェアでの使用例 】

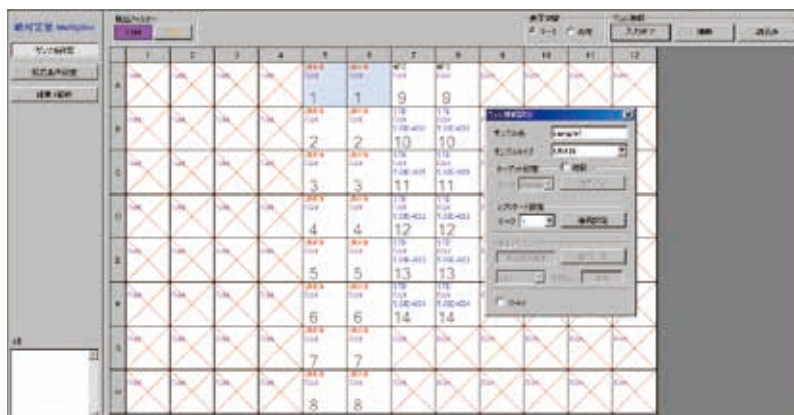
絶対定量による実施例

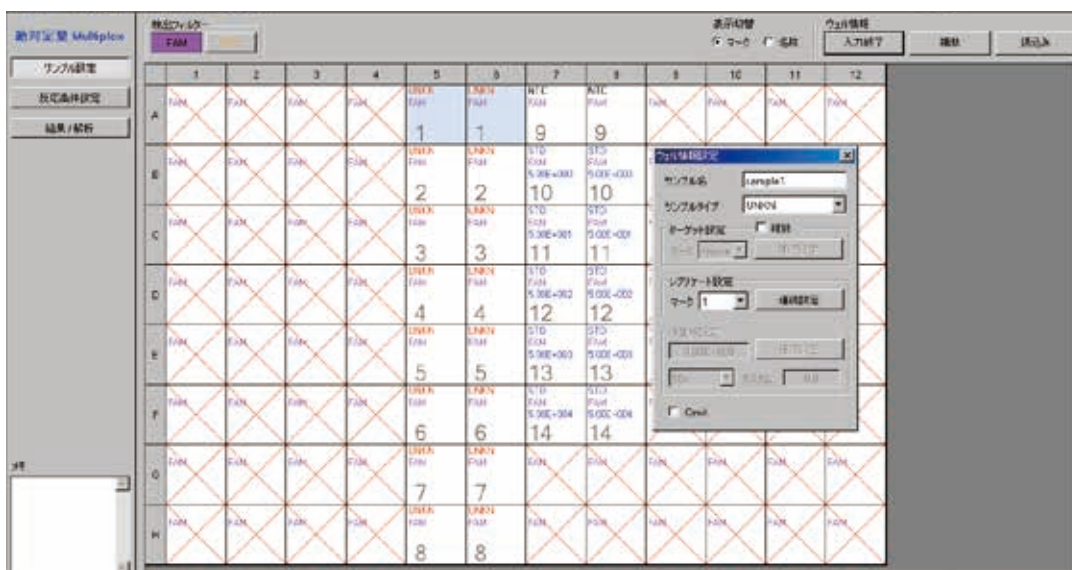
（1）ランファイルを新規作成し、“ 新規測定 ” ウィンドウにおいて解析タイプ≪絶対定量≫を選択し、多波長検出に ☑ を入れ、OK ボタンをクリックする。

※ ≪絶対定量≫は、食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。Thermal Cycler Dice Real Time System Software をご使用の場合は、＜ Absolute Quantification ＞を使用します。
解析ソフトのバージョンアップが必要な場合は、弊社ウェブサイトの資料請求／ダウンロードサービス「Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェアバージョンアップのご案内」よりダウンロードしてください。

(2) 反応条件設定画面で、PCR 条件および検出する蛍光フィルターの選択を画面左上の≪検出フィルター≫で行う。本製品では FAM と ROX の両方を測定するので、FAM と ROX 両者にチェックが入っていることを確認する。

(注) ≪ Collect Data ≫でチェックしなかった蛍光フィルターのデータは保存されませんので、ご注意ください。

PCR 条件を設定する。パターンから 3 Step PCR を選ぶ。
初期変性［Hold 95℃ /10 秒］と 3 Step PCR［(95℃ /5 秒 _55℃ /10 秒 _72℃ /20 秒) × 45 cycles］の温度条件で反応を行う。

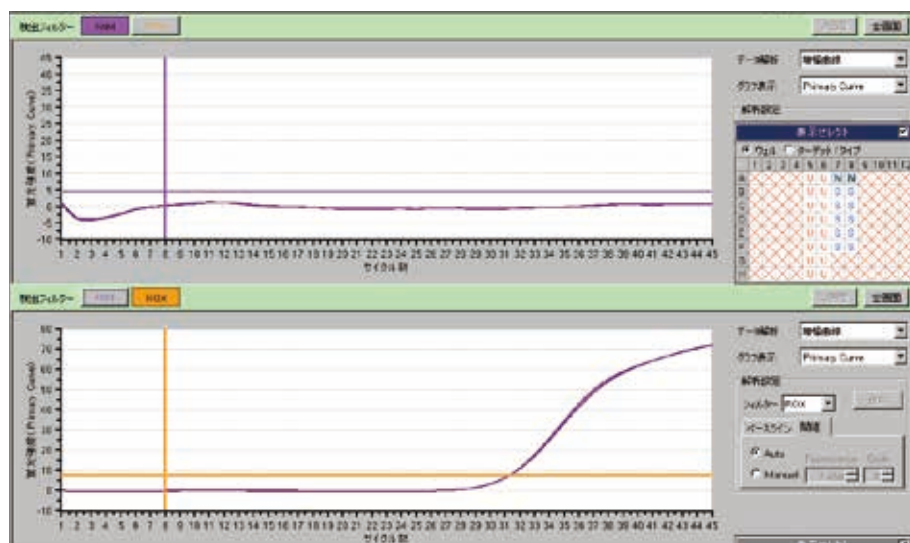
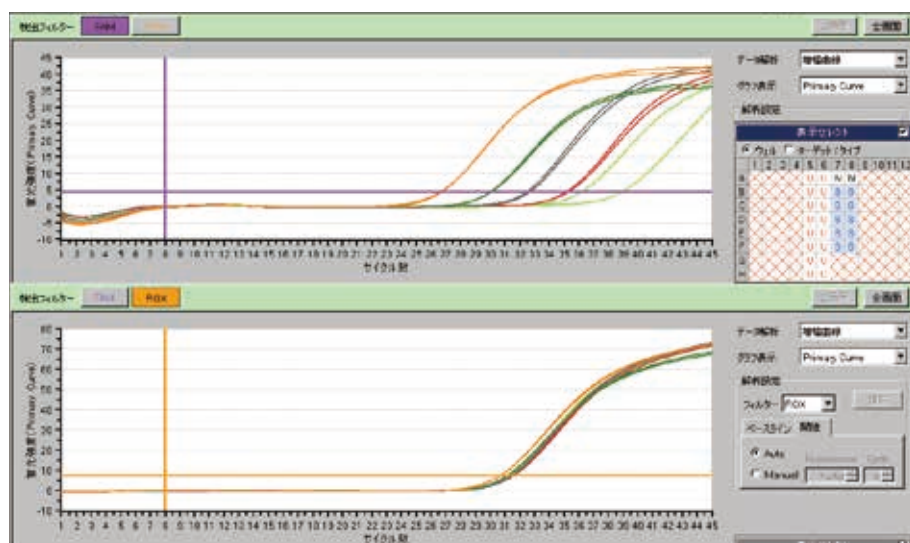
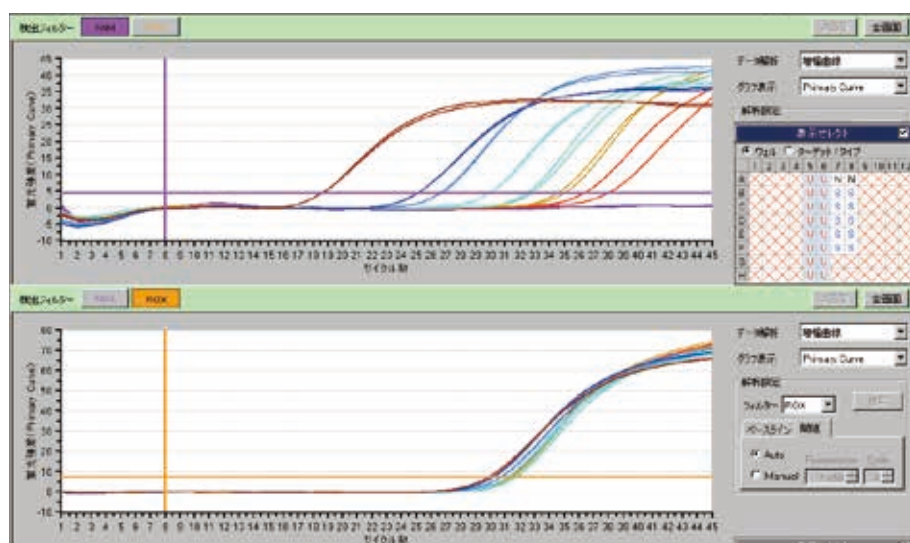
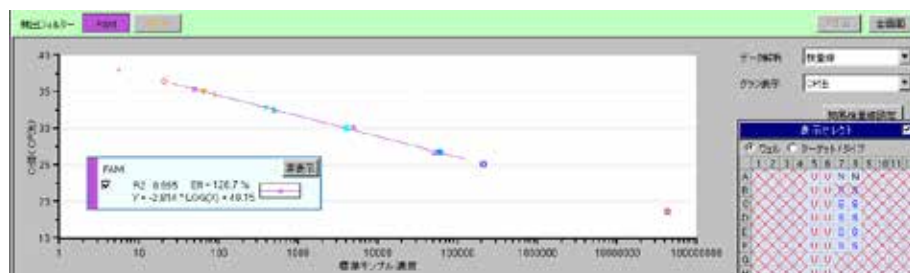
初期変性 (Hold)
　Cycle：1
　95℃　10 秒
3step PCR
　Cycle：45
　95℃　 5 秒
　55℃　10 秒
　72℃　20 秒 (検出)

(3) 画面右下の " 反応開始 " ボタンをクリックして反応を開始する。

(4) サンプル設定画面でサンプル情報の設定を行う。

同じサンプルを複数測定する場合はレプリケート設定し、反応に使用しないウェルは Omit 設定する。

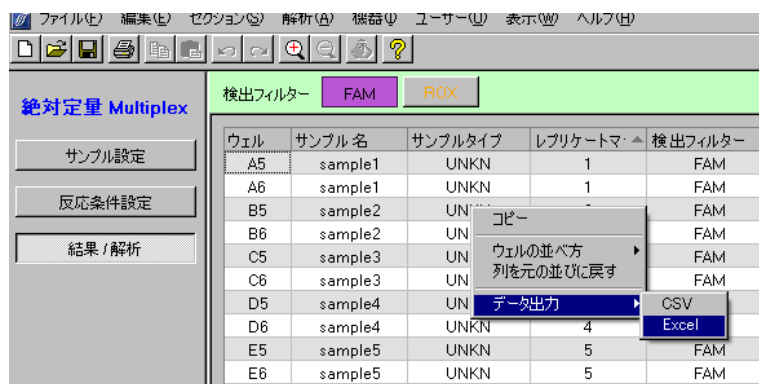
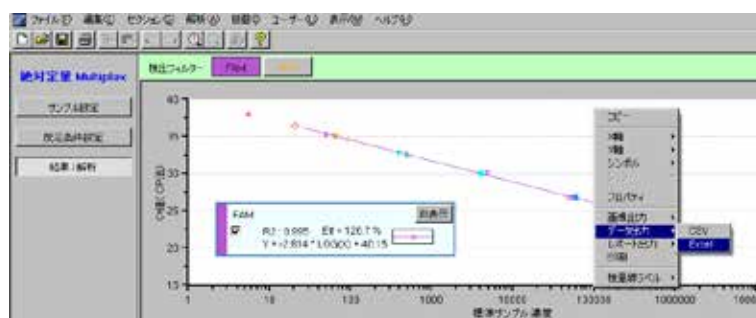
サンプル名	サンプルタイプ	初期鋳型量 （検量線設定）
Negative control	NTC	―
Control DNA	STD	5.00E+000 （5 コピー）
Control DNA	STD	5.00E+001 （50 コピー）
Control DNA	STD	5.00E+002 （500 コピー）
Control DNA	STD	5.00E+003 （5,000 コピー）
Control DNA	STD	5.00E+004 （50,000 コピー）
Sample ・ ・ ・	UNKN	―

（5）反応終了後、結果／解析画面で結果を確認する。

増幅曲線の Primary Curve を表示して、上段で検出フィルター≪ FAM ≫、下段で≪ ROX ≫を選択し、閾値を表示する。

表示セレクトで≪ N ≫ウェルを選択し、検出フィルター≪ FAM ≫において蛍光シグナルに変化がなく、閾値を超えないこと、および検出フィルター≪ ROX ≫で増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

表示セレクトで≪ S ≫ウェルを選択し、検出フィルター≪ FAM ≫で増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、検出フィルター≪ ROX ≫で増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

表示セレクトで≪ U ≫ウェルを選択し、検出フィルター≪ FAM ≫においてベースラインや増幅曲線が正常に描かれていることを確認する。Filter ≪ ROX ≫においても増幅曲線が描かれていることを確認する。
（レジオネラ 5S 遺伝子が多く存在すると FAM シグナルが早く立ち上がり、インターナルコントロールの ROX シグナルが検出できなくなることがある。そのような場合は、PCR 反応は正常に行われているので問題はない。）

データ解析≪検量線≫、グラフ表示≪ CP 法≫に設定し、検量線が作成できていることを確認する。
このとき、5 コピーの 5S Positive Control 2 の反応は検出が不安定なため削除（Omit）して解析から除外した方が検量線の直線性が高くなることが多い。

データ解析≪テキストレポート≫、表示項目≪ CP 法データ≫に設定し、データを取得する。
詳細項目は、必要に応じて表示する。[例：ウェル、サンプル名、サンプルタイプ、レプリケートマーク、検出フィルター、Ct 値（CP）、標準サンプル濃度、定量値（CP）、定量平均値（CP）]

（6） データの出力をする。

テキストレポート表示、または検量線表示画面で右クリックし、データ出力で Excel を選択し出力する。

算出された定量値はプラスミド DNA に換算したコピー数である。

（7）コピー数から菌数（cfu）に換算する。

定量解析で得られたコピー数を、cfu= コピー数／ 17 の計算式で菌数（cfu）に換算する。ただし、本キットは遺伝子検出用キットであるため、死菌の遺伝子も検出されます。正確な生菌数が必要な場合には、培養法による検査も行う必要があります。

【 計算例 】

E5	sample5	UNKN	5	FAM	29.98	–	4.112E+003	4.046E+003
E6	sample5	UNKN	5	FAM	30.02	–	3.980E+003	4.046E+003

sample 5 の場合、5S Positive Contorol 2 によるスタンダードサンプルを用いて作成した検量線の範囲内である。定量平均値は 4.046 × 10^3 コピーであり、計算上約 2.4 × 10^2 cfu と算出される。

H5	sample8	UNKN	8	FAM	18.68	–	4.263E+007	4.298E+007
H6	sample8	UNKN	8	FAM	18.66	–	4.333E+007	4.298E+007

sample 8 の場合、5S Positive Contorol 2 によるスタンダードサンプルを用いて作成した検量線の範囲外ではあるが、定量平均値は 4.298 × 10^7 コピーであり、計算上約 2.5 × 10^6 cfu と算出される。

【Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）の場合】

増幅反応は以下の手順で行う。

（1） Advanced Setup で New Experiment を作成する。

（2） Experiment Properties にて Quantification-Standard Curve を選択し、TaqMan Reagents または Other を選択する。（Other を選択した場合は Include Melt Curve の☑は外しておく。）

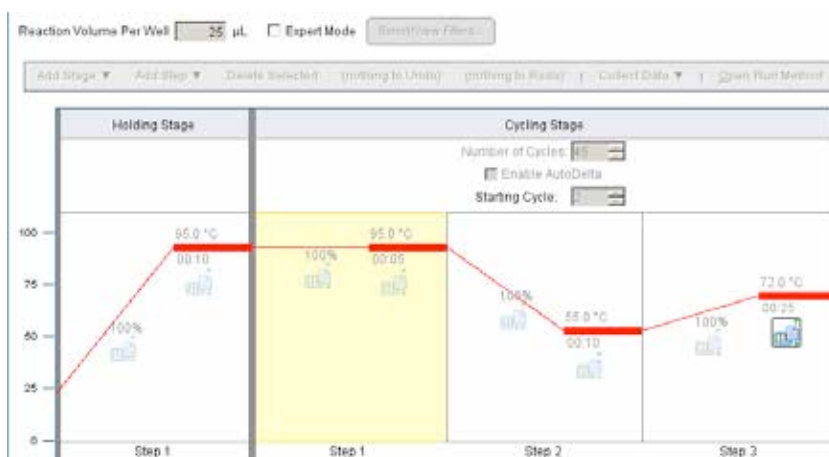
（3） Plate Setup の Define Target にて Target Name を 5 S、Reporter を FAM、Quencher を（none）にしたものを作成する。

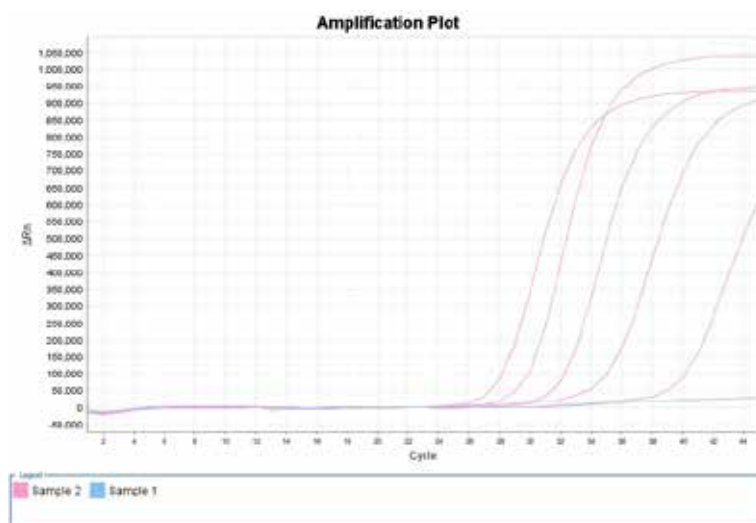
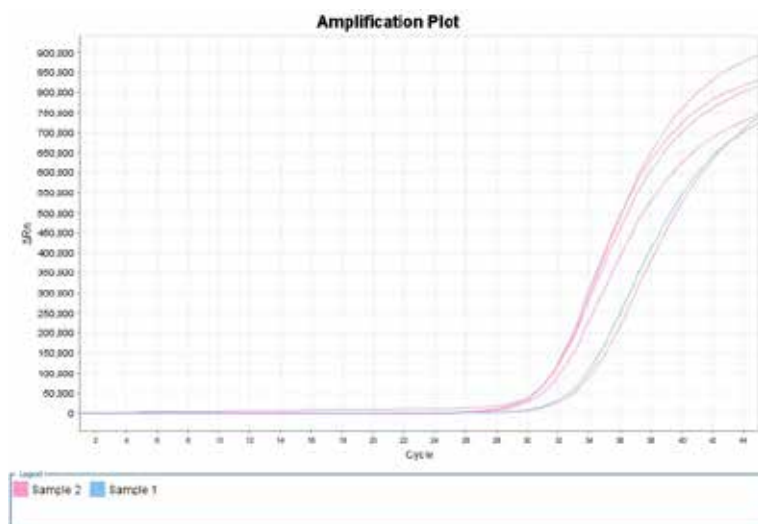
（4） Plate Setup の Define Target にて Target Name を IC、Reporter を ROX、Quencher を（none）にしたものを作成する。

（5） Define Samples にて NC、PC とサンプルを設定する。

（6） （3）、（4）、（5）で作成した設定を用いて Plate Layout を設定する。
Passive Reference は（none）にする。

（7） Instrument タブをクリックし、以下の反応条件を入力する。

初期変性（Hold）
　Cycle：1
　95℃　10 秒
3 step PCR
　Cycle：45
　95℃　 5 秒
　55℃　10 秒
　72℃　25 秒（検出）

（8）　反応チューブをセットし、Start ボタンをクリックして反応を開始する。

（9）　反応終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線が確認できる。
（Target のプルダウンメニューから各々のターゲットを選択）
※ Threshold、Baseline は必要に応じて Manual にて設定する必要があります。

5S rRNA 遺伝子の検出（FAM）

Internal Control の検出（ROX）

（10） 検量線作成用のスタンダードサンプルで反応を行った場合は、Standard Curve タブをクリックして検量線を参照できる。

（11） View Well Table タブをクリックして結果のデータを参照できる。

※ StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies）も同様な操作で使用できます。ただし、ROX の検出感度が低いため、全 target を同時に表示すると、ROX（IC）の増幅曲線が小さく表示されます。FAM と ROX の target を別々に表示させて解析してください。

<オプション：＋／－判定での解析>

＋／－判定では、ターゲット遺伝子が陽性か、検出限界以下であるかを判定します。この場合、検量線用スタンダードサンプルを調製する必要はありません。

操作の概要

1. サンプルの調製（10 ページ参照）
2. リアルタイム PCR 装置のセッティング
3. 反応液の調製と反応開始

 反応液を調製する。
 ↓
 反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール（滅菌水）、または検体サンプル、または陽性コントロール（5S Positive Control 2）を添加する。
 ↓
 反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する。
 ↓

4. 結果表示

 画面上にリアルタイムで増幅曲線が表示される。
 ↓

 反応終了
 ↓
 判定

1. 反応液の調製と反応開始

(1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）

検体サンプル等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数＋α分調製し、各反応チューブに 20 μl ずつ分注して軽くキャップを閉める。その内の 1 本に陰性コントロールとして滅菌水 5 μl を加え、反応チューブのキャップをしっかり閉める。（N=2 以上での反応を推奨）

	液量（1 反応）	最終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture ●	12.5 μl	1 ×
5S Primer/Probe Mix（5 × conc.）●	5 μl	1 ×
検体サンプルまたは 5S Positive Control 2 ● または滅菌水	（5 μl）＊	
dH_2O ○	2.5 μl	
Total	25 μl	

＊：検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えない。

エリア 3 へ移動

(2) サンプル（鋳型）の添加（エリア 3 で実施）

陰性コントロール以外の反応チューブについて、検体サンプルや 5S Positive Control 2（陽性コントロール）を、(1) で分注した調製液に添加し、反応チューブのキャップをしっかり閉める。

蛍光測定を行うため、チューブに汚れがつかないように注意し、キャップを閉めるときは手袋を着用する。0.2 ml チューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

2. リアルタイム PCR 装置による増幅・検出～判定（エリア 3 で実施）

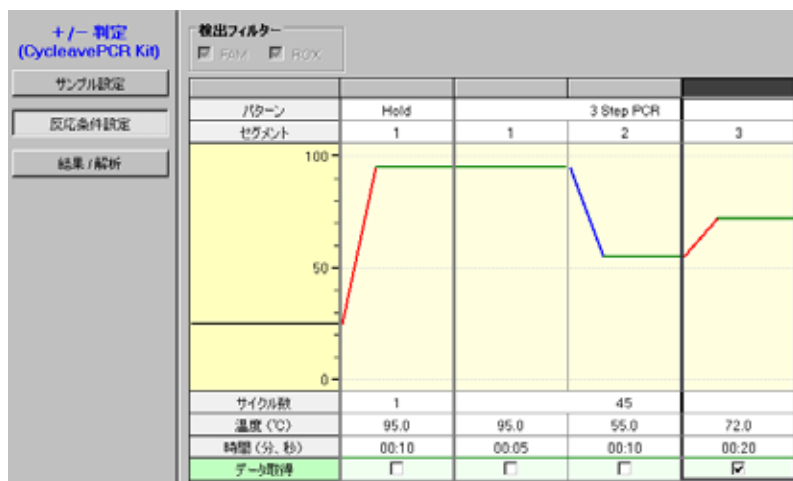
操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System（タカラバイオ）の＋／－判定（CycleavePCR Kit）で解析する場合の概略と結果判定について示します。

＋／－判定（CycleavePCR Kit）による実施例

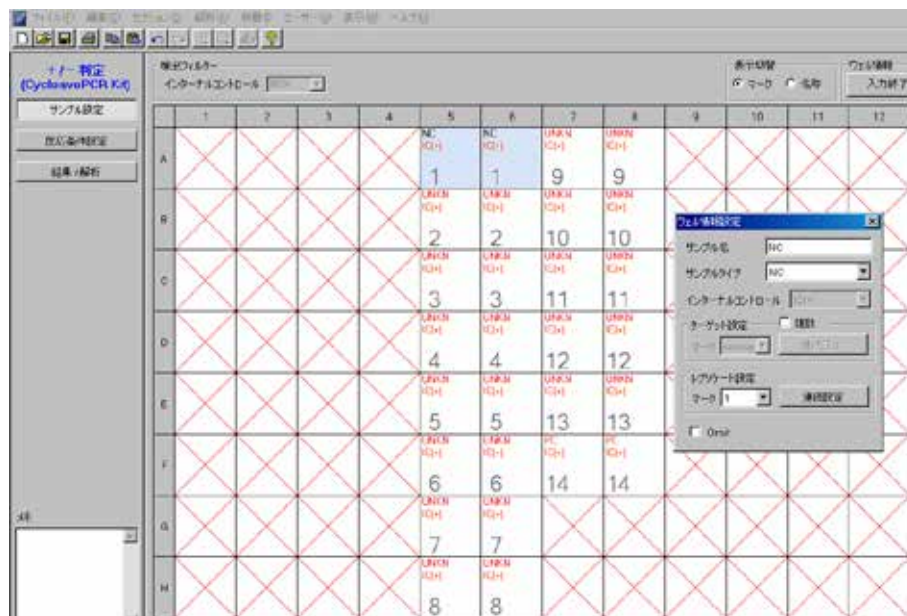
（1）ランファイルを新規作成し、”新規測定”ウィンドウにおいて解析タイプ≪＋／－判定（CycleavePCR Kit）≫を選択し OK ボタンをクリックする。

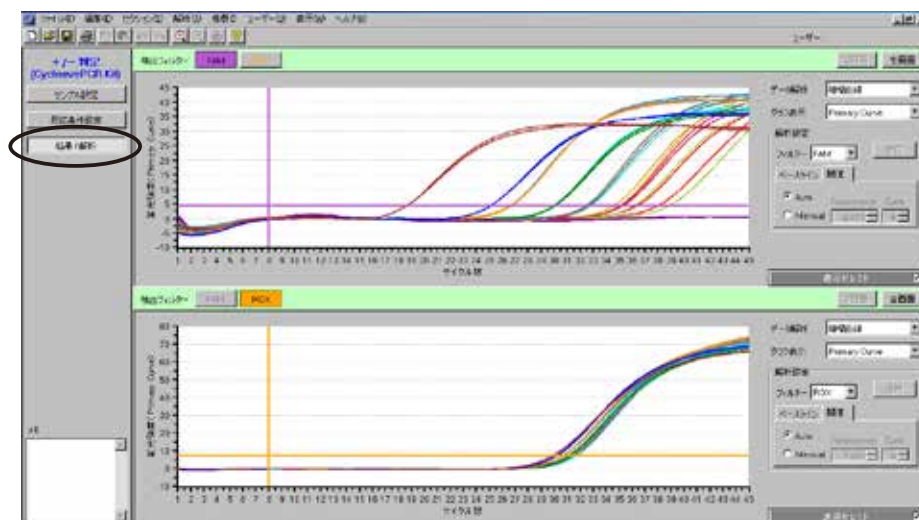
※ ≪＋／－判定（CycleavePCR Kit）≫は食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。Thermal CyclerDice Real Time System Software をご使用の場合は＜PM（M）Plus/Minus Assay ＞を使用します。
解析ソフトのバージョンアップが必要な場合は、弊社ウェブサイト資料請求のダウンロードサービス「Thermal CyclerDice Real Time System ソフトウェアバージョンアップのご案内」よりダウンロードしてください。

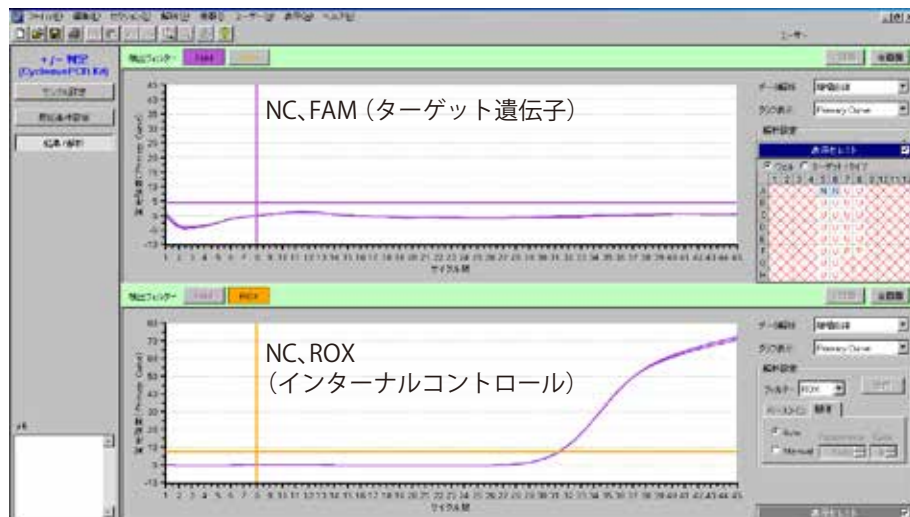
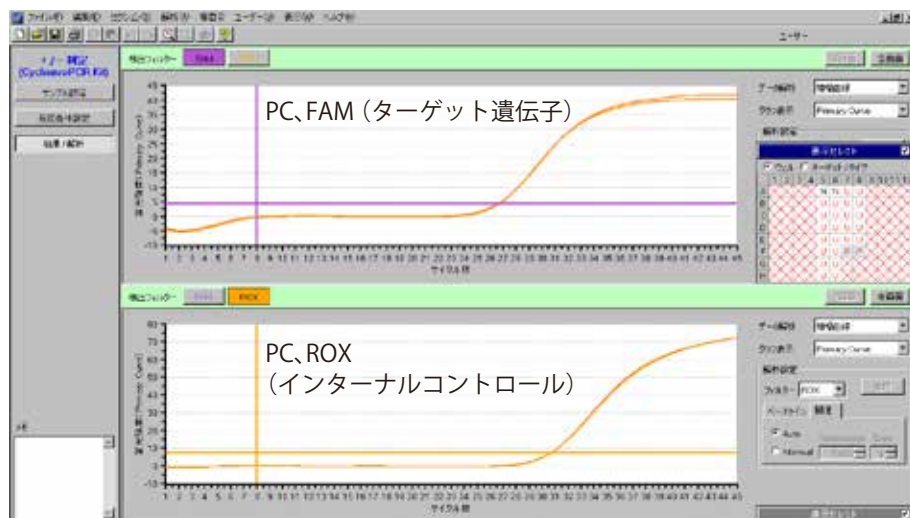
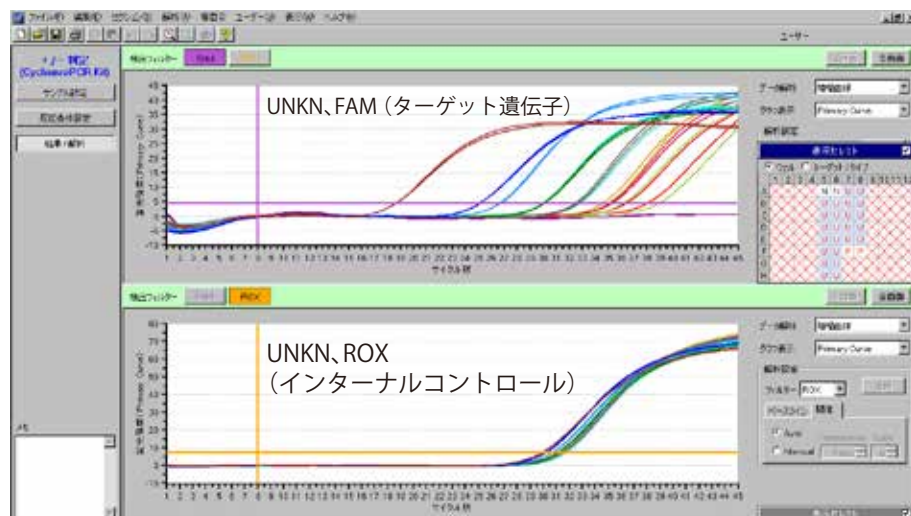
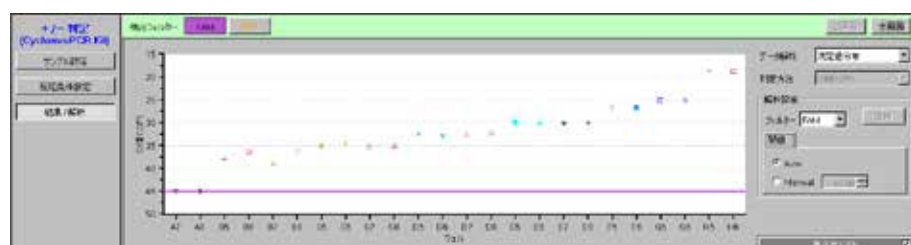
（2）反応条件設定画面では、デフォルトで検出フィルターは FAM と ROX の両方にチェックが入っており（これは変更できません）、PCR 条件は以下の条件になっていることを確認する（変更は可能ですが、このデフォルト値を使用します）。

初期変性（Hold）
Cycle：1
95℃　10 秒
3step PCR
Cycle：45
95℃　5 秒
55℃　10 秒
72℃　20 秒（検出）

（3）画面右下の”反応開始”ボタンをクリックして反応を開始する。

反応開始

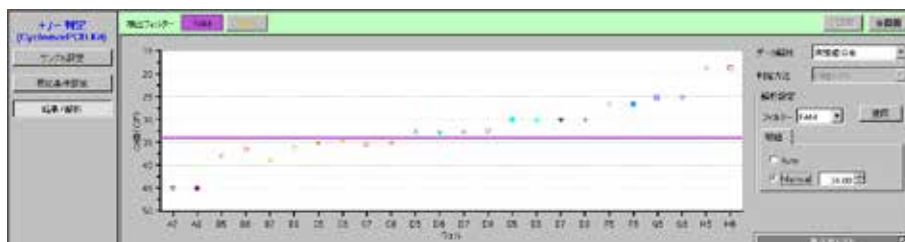
（4）サンプル設定画面でサンプル情報の設定を行う。

Internal Control は、デフォルトで ROX に設定されている（変更できません）。
同じサンプルを複数測定する場合はレプリケート設定し、反応に使用しないウェルは Omit 設定する。
判定の信頼性を高めるため、2 連以上での反応を推奨する。

（5）反応終了後、結果／解析画面で結果を確認する。
反応終了後、“結果／解析”ボタンをクリックする。

二画面の上部にターゲット検出の FAM フィルターでの増幅曲線が、下部にインターナルコントロール検出の ROX フィルターでの増幅曲線が表示される。(閾値は Auto で表示)

表示セレクトで≪ N ≫ウェルを選択し、検出フィルター≪ FAM ≫において蛍光シグナルに変化がなく、閾値を超えないこと、および検出フィルター≪ ROX ≫で増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

表示セレクトで≪ P ≫ウェルを選択し、検出フィルター≪ FAM ≫で増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、検出フィルター≪ ROX ≫で増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

表示セレクトで≪ U ≫ウェルを選択し、検出フィルター≪ FAM ≫においてベースラインや増幅曲線が正常に描かれていることを確認する。Filter ≪ ROX ≫においても増幅曲線が描かれていることを確認する。
（レジオネラ 5S 遺伝子が多く存在すると FAM シグナルが早く立ち上がり、インターナルコントロールの ROX シグナルが検出できなくなることがある。そのような場合は、PCR 反応は正常に行われているので問題はない。）

データ解析を≪測定値分布≫にする。
（注意）ターゲット設定を " 複数 "（Multi-Target）で反応した場合、表示セレクトでターゲット別にウェルを選択して閾値を選択する。異なるターゲットを同時に選択すると閾値は表示されない。

デフォルトでは 45 サイクルのリアルタイム PCR において、各ターゲット反応での Ct 値が算出された場合に陽性と判定するように設定されている。

参考

使用する陽性コントロールの濃度を調整することにより、陽性の判定の基準を設定することができる。
例えば 170 コピー（8 ページに記載の方法に従って換算して 10 cfu 相当）以上が検出された場合に陽性と判定されるように設定するには、添付の 5S Positive Control 2（1 × 10^4 copies/μl）を 300 倍希釈したもの、5 μl を Positive Control として添加した反応により得られた Ct 値を Manual の閾値として入力する。

（例）添付の 5S Positive Control 2（1 × 10^4 copies/μl）を 300 倍希釈し、5 μl を Positive Control として添加した反応により得られた Ct 値が 34 であった場合。FAM フィルターの閾値の設定を Manual に変更し、34 を入力して " 適用 " ボタンを押す。

データ解析を≪判定結果≫にすると測定値分布で設定した閾値を基準にして
＋ / −判定結果が表示される。

Negative Control ≪ N ≫陰性コントロール、Positive Control ≪ P ≫陽性コントロールの結果の表示

OK ： コントロール反応が正常（反応系が正しく進んだことを示す。）
OUT ： コントロール反応が異常（反応系が正しく進んでいないことを示す。）

Unknown ≪ U ≫検体サンプルの結果の表示

Posi ： ターゲット遺伝子の検出が陽性
Nega ： ターゲット遺伝子が検出限界以下
ND ： Internal Control、ターゲット遺伝子のどちらも検出せず、判定不能（PCR 反応がうまく進まなかったことを示す。）
Error ： 同一 Replicate 内で判定が異なることを示す。

データ解析≪テキストレポート≫表示項目≪ CP 法データ≫に設定し、データを取得する。
詳細項目はウェル、サンプル名、サンプルタイプ、レプリケートマーク、検出フィルター、Ct 値（CP）、結果（CP）、判定（CP）など必要に応じて表示する。

（6）データの出力をする。
テキストレポート表示、または判定結果の総合判定画面で右クリックし、データ出力で Excel を選択し出力する。

3. 判定結果表（＋／－判定）

判定結果表 1：
サンプルを添加した場合（各コントロール反応の結果とあわせて最終判定を行うこと）

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（5S rRNA）	増幅シグナル（＋）	5S rRNA 遺伝子陽性＊1	5S rRNA 遺伝子陽性＊1
	増幅シグナル（－）	5S rRNA 遺伝子検出限界以下＊2	判定不能＊3

判定結果表 2：
ポジティブコントロール（5S Positive Control 2 を添加したもの）

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（5S rRNA）	増幅シグナル（＋）	5S 検出系に問題なし	5S 検出系に問題なし
	増幅シグナル（－）	5S 検出系に問題あり＊4	判定不能＊3

判定結果表 3：
ネガティブコントロール（滅菌蒸留水を添加したもの）

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（5S rRNA）	増幅シグナル（＋）	5S コンタミネーションの疑い＊5	5S コンタミネーションの疑い＊5
	増幅シグナル（－）	5S コンタミネーションはない	判定不能＊3

＊ 1：インターナルコントロールの（＋）/（－）に関わらず、5S rRNA 遺伝子が陽性である。ネガティブコントロール反応の結果から反応系にコンタミネーションがなかったことを確認すること。
＊ 2：ポジティブコントロールの反応で（＋）となる（反応系に問題がない）ことを確認すること。
＊ 3：何らかの原因でPCR反応またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、場合によっては検体の再調製が必要。
＊ 4：5S 増幅用プライマーあるいは 5S 検出用プローブに問題があるか、5S ポジティブコントロールが分解している。
＊ 5：コンタミネーションの疑いがある場合は、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。

IX. 判定結果についての注意事項

- 陰性コントロール反応で FAM フィルターにおいて、増幅曲線、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られた場合
  → コンタミネーションの疑いがあるため、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。

- スタンダードサンプルおよび陽性コントロールの反応で FAM フィルター、ROX フィルターの両者で増幅曲線、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られなかった場合
  → 何らかの原因で PCR 反応、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。

- スタンダードサンプル（5 copies での反応を除く）および陽性コントロールの反応で、増幅曲線、Primary Curve の設定で、ROX フィルターでは増幅曲線が得られるが、FAM フィルターでは増幅曲線が得られなかった場合
  → 5S Primer/Probe Mix に問題がある、または、5S Positive Control 2 が分解している可能性がある。

- 検体サンプルの反応で、FAM フィルター、ROX フィルターの両者で、増幅曲線、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られなかった場合
  → 何らかの原因で PCR、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。
  サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、サンプルを希釈して再反応を行う、または検体サンプルの再調製を行い、再反応を行う。

- 検体サンプルの反応で、FAM フィルターで増幅曲線が確認されるが、ROX フィルターで確認されない場合
  → ターゲットの DNA が多い場合、そのターゲットの増幅反応が優先され、インターナルコントロール DNA の増幅反応が競合抑制される場合がある。この場合、ターゲットは陽性であると判定できる。

X. 参考文献

1）Fields, B. S., Benson, R. F., Besser, R. E. (2002) Legionella and Legionnaires' disease:25 years of investigation. *Clin.Microbiol*. Rev., **15**:506-526

2）Benin, A. I., Benson, R. F., Besser, R. E. (2002) Trends in legionnaires disease, 1980-1988: declining mortality and new patterns of diagnosis. *Clin. Infect. Dis*., **35**:1039-1046

3）Schraft. H., *et al*. (1995) *Applied and Enviromental Microbiology*. **61**.98-102

4）厚生労働科学研究費補助金地域健康危機管理研究事業「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」：平成 19 年度 総括・分担研究報告書

5）「第 3 版レジオネラ症防止指針」（発行：財団法人ビル管理教育センター）

XI. 関連製品

Cycleave®PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（製品コード CY240/CY240S）
Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR（製品コード 7730/7730S）
Cycleave® RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit（製品コード CY230）
Cycleave® RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit（製品コード CY231）
NucleoSpin Tissue XS（製品コード 740901.10/.50/.250）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）
96well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）
Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）
Plate Sealing Pads（製品コード 9090）
0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）

XII. 注意

- 本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないでようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Cycleave、*TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。